

## ナス胚軸カルスからの不定芽および不定胚の分化に関する研究

著者	松岡 秀道
号	207
発行年	1977
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16980">http://hdl.handle.net/10097/16980</a>

氏 名 (本籍)	まつ 松	おか 岡	ひで 秀	みち 道
学 位 の 種 類	農	学	博	士
学 位 記 番 号	農 博 第	2 0 7	号	
学位授与年月日	昭和 5 3 年	3 月 2 4 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻			
学 位 論 文 題 目	ナス胚軸カルスからの不定芽および 不定胚の分化に関する研究			

論文審査委員 (主 査)

教授 角田重三郎      教授 堀      裕

教授 高橋成人

## 論文内容要旨

最近の組織培養法の発達によって薬培養による半数体の育成，体細胞融合による雑種の作出などが育種法の一つとして取り上げられるようになった。また一方，組織培養は植物の栄養繁殖の新しい手法としても期待されている。現在のところこれらの手法の一般化が困難な一つの大きな理由は，カルスからの芽の誘導が植物によっては困難であることにある。特に植物の増殖に組織培養を利用する場合は，カルスの増殖と共に，カルスから能率良く多数の芽を得ることが必要である。

本論文ではナス科の一蔬菜であるナスの胚軸を供試材料として，そのカルスからの器官分化，特に芽の分化について検討した。そして芽の分化にはNAA濃度に依存して2通りの分化様式があることを明らかにした（第1章）。この分化過程を組織形態学的に観察し，低濃度のNAAでは不定芽分化，高濃度のNAAでは不定胚分化を起こすことを明らかにした（第2章）。不定胚の発達したものは，カルスの表面で淡黄緑色のスポットとして認められるのでそれをGreen Spotと名づけて不定胚分化の指標とし，不定胚の分化を促進する諸条件を検討した（第3章）。さらに，カルスを継代培養することによって生じる芽の分化能の変化及び遺伝的変異も検討した（第4章）。

### 第1章 胚軸切片のNAAと6-BAに対する反応

NAAと6-BAの濃度を変えて，根の分化，芽の分化及びカルスの生育について観察し，またそれらの品種間差異を検討した。

根の分化は胚軸切片の下端から生じ，低濃度のNAAによって促進され，6-BA添加によって抑制される。

芽の分化には2通りの様式が見られた（Fig. 1）。一つは低濃度のNAA（0，0.016 mg/ℓ）によって胚軸切片の上端から生じる芽であって，6-BA添加によって促進される。他の一つは高濃度のNAA（1.62，8.10 mg/ℓ）を加えると3週目以降のカルス表面に生じるものであって，6-BA添加によって抑制される。後者の芽はカルス表面に淡黄緑色のスポットとして認められ，

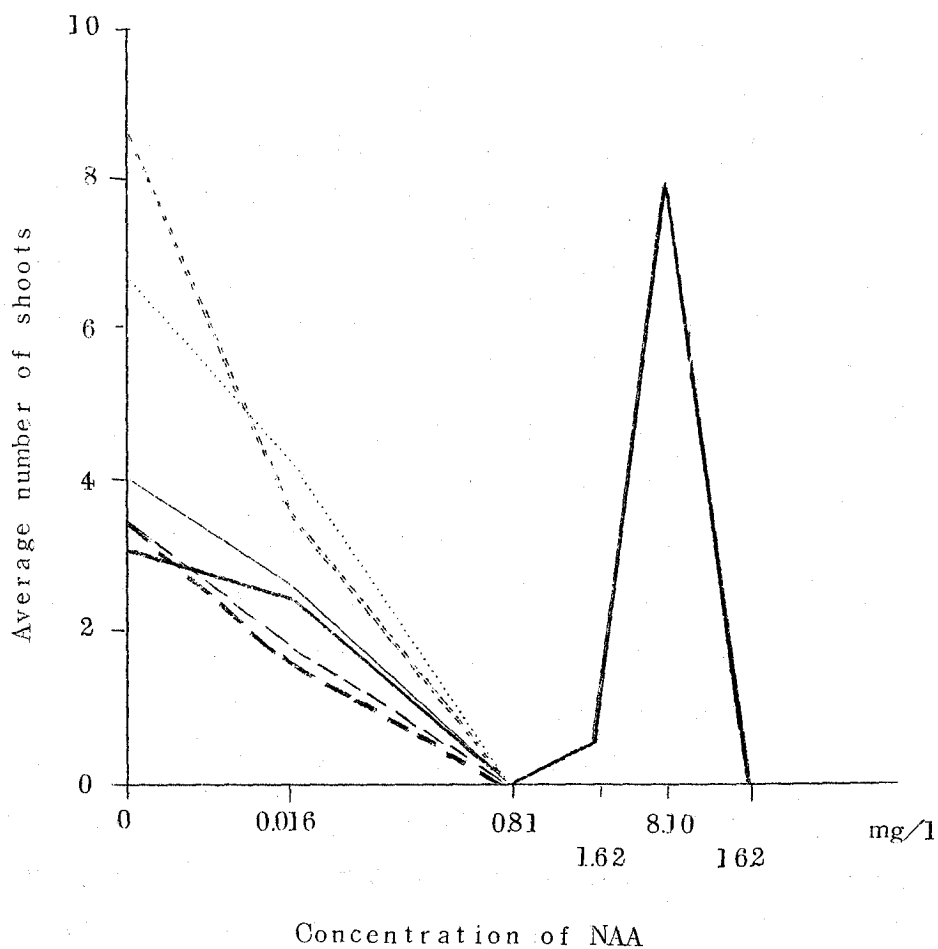


Fig. 1 Effect of NAA and 6-BA on shoot differentiation;  
average number of shoots per the callus which  
differentiated shoots.

6-BA conc. (mg/l)		3 weeks	6 weeks
0	:	_____	_____
0.225	:	_____	_____
2.25	:	_____	_____

照明下に移すとこのスポットが緑化するため Green Spot と名づけた。なお両者の芽の分化が起こる中間の NAA 濃度 ( $0.8 \text{ } \mu\text{g}/\ell$ ) では芽の分化が認められない。

カルスの生育は、NAA 濃度が  $0.8 \text{ } \mu\text{g}/\ell$  以上では NAA 濃度の低い方がよい。NAA  $0.8 \text{ } \mu\text{g}/\ell$  以下では根と芽の分化が起こる。

上記の各生育反応の相互関係を芽の分化を中心として品種間で検討した。

微量の NAA 単独添加によって芽の分化を起こしやすい品種は根の分化も起こしやすい。

一方、NAA  $8.10 \text{ } \mu\text{g}/\ell$  で形成された Green Spot 数を各品種の Green Spot 形成能とすると、Green Spot 形成能の高い品種は NAA 低濃度での根の分化数が少い傾向にあった。また Green Spot 形成能と NAA 低濃度での芽の分化数との間には負の相関が見られた。すなわち、Green Spot 形成能の高い品種は概して NAA 低濃度下における根や芽の分化数の少い品種である (Fig. 2)。NAA  $0.8 \text{ } \mu\text{g}/\ell$  以上の区についてカルス新鮮重 (Y) の NAA 濃度 (X) に対する対数回帰直線 ( $\log Y = a + b \log X$ ) を求め、カルスの生育量と Green Spot 形成能との関係を検討した。Green Spot 形成能は回帰直線の傾き (b) と正、定数 (a) と負に相関する傾向を示す。Green Spot 形成能の高い品種は胚軸切片が脱分化を起こす程度の NAA 濃度ではカルスの生育があまり良くないが、高濃度の NAA でもなお比較的良くカルスが生育する品種であると言える。

IAA は根の分化を促進し、芽の分化を抑制する作用を持っていた。一方、2, 4-D を含む培地では 6-BA の有無にかかわらず器官分化が起こらなかった。

以上の知見から、ナス胚軸カルスは NAA 濃度により 2通りの様式の芽が分化し、NAA 低濃度によって形成される芽と NAA 高濃度によって形成される Green Spot があることが指摘された。

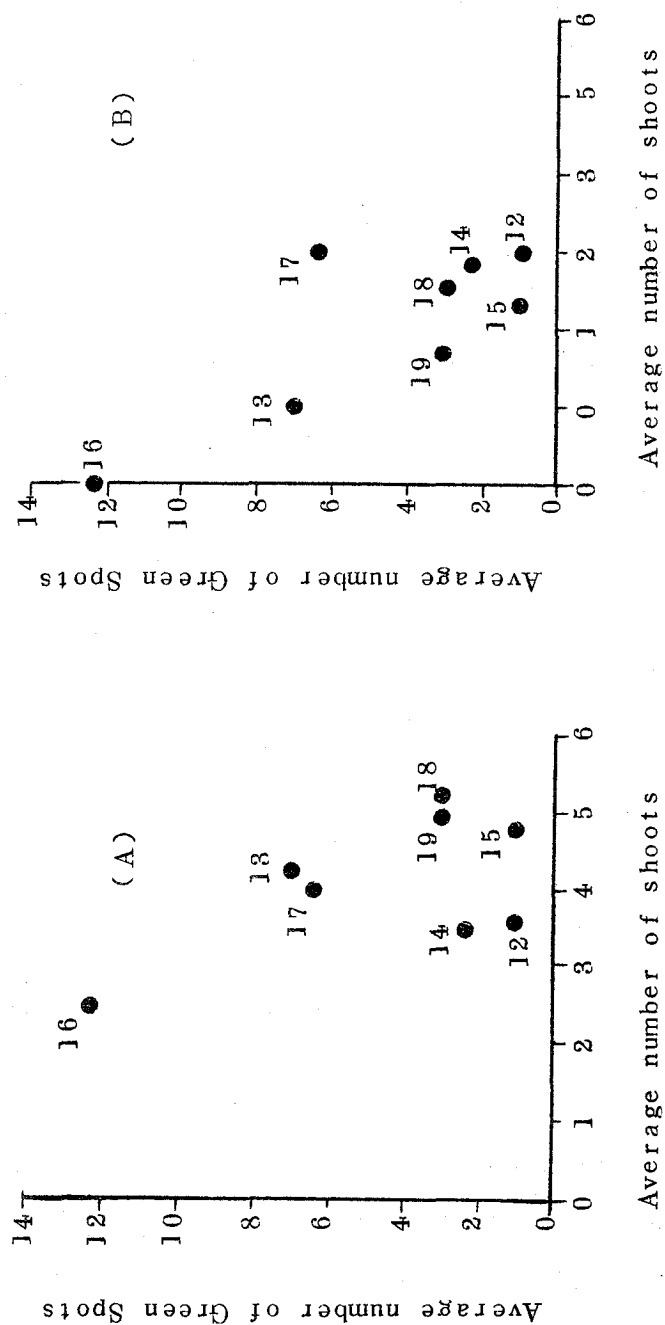


Fig. 2 Relationship between the average number of Green Spots (on the medium with 8.10 mg/l NAA) and the average number of shoots ( 0 mg/l NAA and 0 mg/l 6-BA (A) , and 0.016 mg/l NAA and 0 mg/l 6-BA (B) ) , observed among 8 cultivars.

## 第2章 NAA低濃度下と高濃度下における芽の分化の組織形態学的観察

前章でNAA濃度の差によって2通りの芽が分化することを指摘したが、本章ではそれらの発生過程を組織形態学的に観察した。

NAA低濃度の場合、置床後1日目から胚軸上端に細胞分裂が見られカルス化してくる。6日目になるとカルスの表面に芽の分化の徴候が現われてくる。この芽の分化は、最初カルスの表面に表皮細胞層状のものが発達してきて、しだいに生長点状の構造になり、ついには葉原基を分化する。このような芽の分化様式は不定芽 (adventitious shoot) のそれである。

NAA高濃度の時には胚軸全体がカルス化し、そのカルス表面の切片を作ると糸状胚期、球状胚期、心臓胚期、子葉胚期の各ステージに相当する胚状構造をした細胞塊が見られた。これらのことから、この芽の分化ではカルス表面に胚状の細胞塊ができ胚発生と似た分裂様式を経て幼植物へと発達する。このような芽の分化は不定胚 (embryoid) 分化である。

分化した不定胚は高濃度のNAAを含む培地そのままでは、一定の生長段階で発達を停止したり再び脱分化するが、それをNAAを含まない培地へと移植することにより正常な植物体を得ることができる。その際、カルスをバラバラにして移植するプレーティング操作が有効である。また、NAA高濃度下で形成されるGreen Spotは不定胚が葉原基を形成して肉眼で認められるまでに発達したものであり、Green Spotは不定胚分化の指標となり得ることがわかった。

## 第3章 不定胚分化を促す諸条件の検討

第2章でGreen Spotは不定胚分化の指標となり得ることがわかったので、本章ではNAA高濃度下で起こる不定胚分化を高率にしかも確実に得る条件をGreen Spotを指標として検討した。

不定胚分化を起こすNAA濃度は7~9 mg/l 程度の所が最も良く、高濃度

のNAAを与えることが必要であった。

NAA培地での培養期間が10週間以下では、Green Spotの発達にプレーティング後長期間を要し、NAAを与える期間を長くするとプレーティング後短期間でGreen Spotを発達させる。しかし、Green Spot形成率 (Fig. 3) とGreen Spot数 (Fig. 4) の両者は平行的に増減せず、NAA培地での培養期間が長いとGreen Spot数はあまり多くなく、NAA培地での培養期間が短いと逆にGreen Spot形成率はそれ程高くないが、Green Spot数は多くなった。多くのカルスから多数のGreen Spotを得るためには両者のバランスを考慮して培養期間を設定する必要があることがわかった。

明暗両条件を与えて比較すると、照明区の方にGreen Spot形成がより早く起こり、しかもその数が多く、一層高濃度のNAA培地でも起こり得た。また、定温区 (25℃) と昼夜変温区 (25℃—17℃) を比較したところ、Green Spotは変温区の方で多く形成された。光と変温 (夜低温) は不定胚の分化に対して不可欠と言えるべきものではないが、不定胚の分化をより起こしやすい条件をつくるか、または分化した不定胚の発育を促進するものとみられる。

Green Spot形成に対して置床胚軸切片自体が大きく影響を与えることがわかった。未伸長胚軸 (3 cm, 発芽後5日) と伸長胚軸 (6 cm, 同8日) の上部、中部、下部から各々切片を大、中、小、の大きさで取り出した。11週間培養し、プレーティング時とプレーティング後1週目のGreen Spot数をTable. 1に示した。未伸長胚軸の方が伸長胚軸よりも、また同一伸長程度の胚軸ならば大きな切片を用いた方がGreen Spot数が多かった。一方、切片を取り出す部位による影響は前二者程大きくはなかった。Green Spot数と切片に含まれる細胞数との関係を見ると、細胞数が多ければGreen Spot数も多くなった (Fig. 5)。これらのことから、細胞質の充実した若くて多数の細胞を含むものを供試する重要性が指摘された。



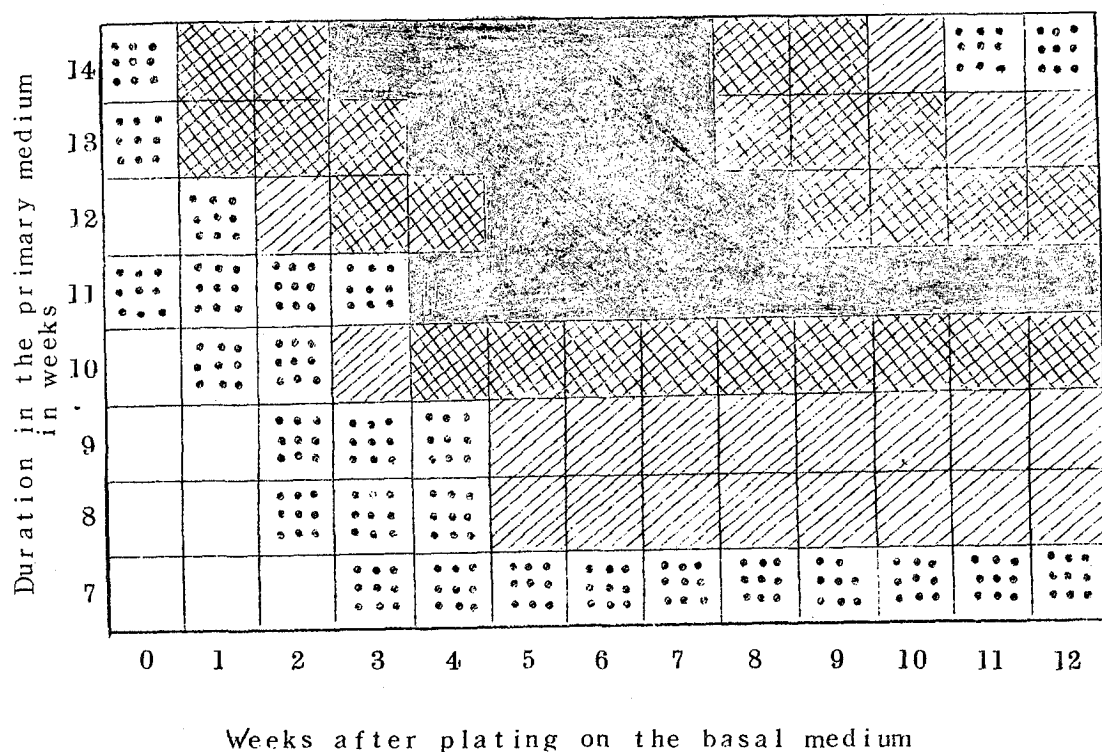
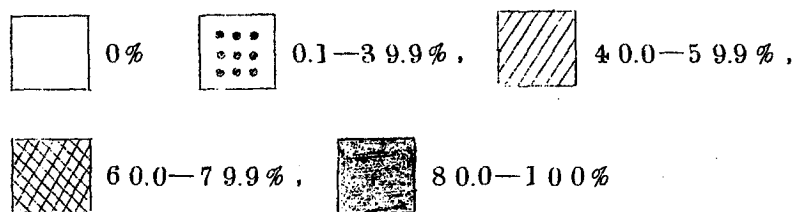


Fig. 3 Effect of the duration of the primary medium with NAA (10mg/l) on the Green Spot formation in terms of the percentage of the calluses differentiated Green Spot to total. Explants were cultured on the primary medium for 7 to 14 weeks and observation was carried out for 12 weeks after "plating" the calluses to NAA free medium.



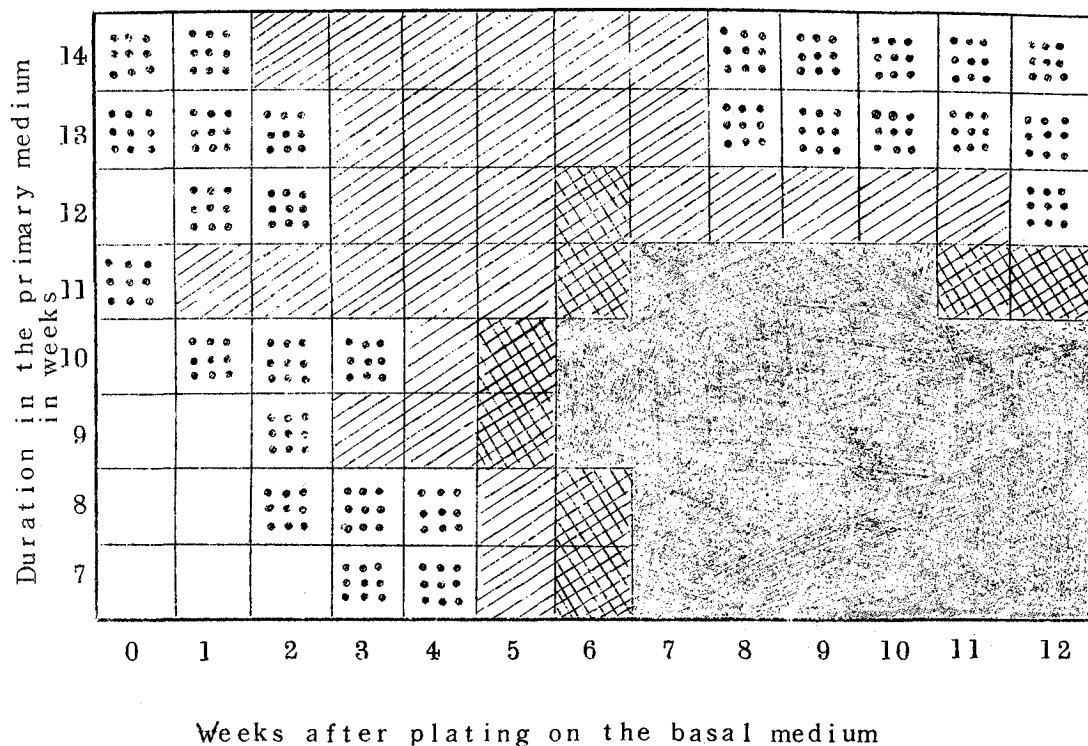


Fig. 4 Effect of the duration of the primary medium with NAA (10mg/l) on the number of Green Spots per the callus which differentiated the Green Spots.

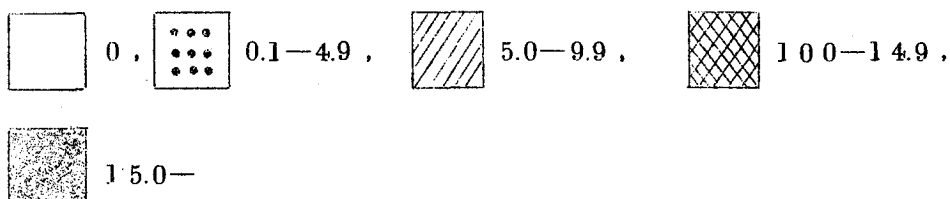


Table 1 Effects of the explant conditions to the Green Spot formation

hypocotyl length	portion	size of explant	number of Green Spots per 10 calluses	
			at the plating time	1 week after plating
short	upper	middle	2	6
		large	51	80
	middle	middle	0	7
		large	19	44
	lower	middle	5	14
		large	35	58
long	upper	middle	0	2
		large	8	25
	middle	middle	4	6
		large	8	16
	lower	middle	8	13
		large	10	22

Explants (middle: 0.8 mg and large: 2.1 mg) were taken from upper, middle and lower portion of hypocotyl elongated short (3 cm) and long (6 cm). Calluses were plated to the NAA free medium 11 weeks after inoculation.

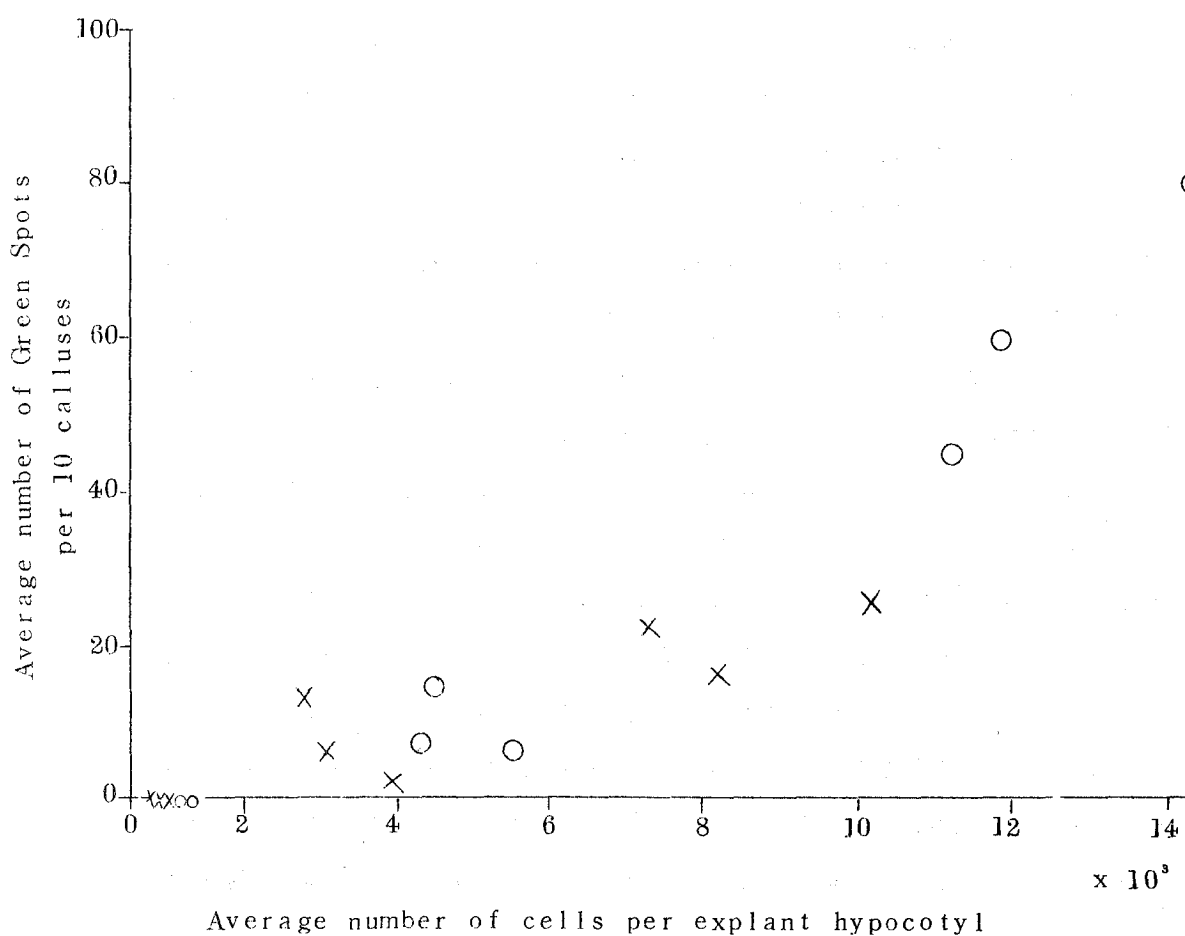


Fig. 5 Relationship between the average number of cells per explant, and the average number of Green Spots per 10 calluses.

Explants were taken from hypocotyls elongated short (○ : 3 cm, 5 days after germination) and long (× : 6 cm, 8 days after germination).

#### 第4章 継代培養した胚軸カルスからのGreen Spot形成と植物体の変異

継代培養したカルスからのGreen Spot及び不定芽の分化率と分化数をTable. 2.に示した。継代培養をしないものよりも1~8回継代培養した方でGreen Spot形成率は高くなっており、Green Spot数も多かった。特に、継代培養5回と6回のものでは全部のカルスに、Green Spotが形成されていた。9回以上になると形成率は徐々に低下していったが、全期間を通じて60%以下になることは稀れであった。Green Spot数についても継代培養を続けることによる低下は17回位までは顕著でなかった。

一方、不定芽の分化は継代培養を重ねるにつれて急激に低下していった。この低下は9回目までが著しく、それ以降17回までは低位で安定していたが、19回目になると芽の分化が見られなくなった。

継代培養1, 3, 7, 8, 11回目のカルスから得られたGreen Spotを植物体に育て、それらの外部形態と染色体数(Table. 3)を調べた。再分化植物には2倍体の他に3倍体、4倍体及び混数体が含まれており、3倍体と4倍体は継代培養回数が多くなると出現してくるようになった。混数体は2個体得られ、共に倍数性関係にある $2n$ 、 $3n$ 、 $4n$ の染色体数を持つ細胞の頻度が高かった。

カルスから不定胚を経由する形での植物の再分化は、(1)同一遺伝子型の植物の増殖に、または(2)育種素材とする変異体を得る手段として利用できるであろう。後者の場合にはカルスの継代培養の回数を比較的多くすることが有利とみられる。

Table 2 Changes of Green Spot forming ability in successive cultures

Successive culture	Percentage of		Av. no. of Green Spots/ Spotted callus		Percentage of		Av. no. of adventitious shoots/shooted	
	plating	3 time weeks	6 plating	3 time weeks	adventitious shoots/shooted	callus	callus	callus
0	500	78.6	84.6	1.9	120	20.6	90.0	7.9
1	66.7	93.3	100.0	2.1	10.8	13.5	70.0	2.3
2	52.6	84.2	82.2	1.7	22.2	20.9	80.0	1.8
3	57.9	94.7	94.7	2.4	20.3	13.6	50.0	2.6
5	47.1	100.0	100.0	1.6	21.4	20.1	40.0	1.5
6	57.1	100.0	100.0	1.8	23.3	20.6	40.0	1.5
7	23.5	76.5	76.5	2.5	18.2	11.5	33.3	1.0
8	31.3	87.5	100.0	1.6	15.6	13.3	40.0	1.3
9	33.3	66.7	66.7	2.3	23.5	9.7	20.0	1.5
10	42.9	85.7	78.6	1.7	11.4	10.6	20.0	1.0
11	23.1	61.5	84.6	1.0	16.8	13.5	30.0	1.0
12	26.7	60.0	53.3	1.3	17.1	6.4	20.0	1.5
15	30.0	90.0	90.0	1.0	20.1	14.1	20.0	1.0
17	0	75.0	87.5	0	12.0	6.4	20.0	1.0
19	13.3	86.7	66.7	1.0	6.8	2.7	0	0

Table 3 Chromosome numbers of the plants derived from  
Green Spots in successive cultures

Number of successive cultures	Plant number	Chromosome numbers (2n)
plant from original seeds		24
1	1	24
3	1	mixoploid
3	2	24
7	13— 1	24
7	13— 7	24
8	1— 7	36
8	14— 8	24
8	14—15	24
8	14—17	48
11	18— 3	mixoploid
11	18— 8	36
11	18—17	36

## 審 査 結 果 の 要 旨

組織培養は単為，生殖や栄養繁殖を誘導する新手法として利用されはじめているが，脱分化したカルスから確実に能率よく芽を分化させることが一つの重要な問題となっている。従来カルスからの芽の分化には，サイトカイニンの添加がそれを促進し，またNAA濃度は比較的低濃度が良く，高濃度のNAAは芽の分化を抑制するとの実験結果が多く報告されていた。

本著者は，ナス胚軸切片の培養で以上と同様の傾向を認めたが，NAA濃度をさらに高めた場合にも芽が分化すること，またこのNAA高濃度下の場合の芽の分化はサイトカイニン添加により阻止されることを認めた。

さらにNAA低濃度でおこりサイトカイニン添加により促進される芽は不定芽であり，NAA高濃度でおこりサイトカイニン添加で阻止される芽の分化は不定胚形成の経過をとることを組織形態調査により明らかにした。これは新知見として評価される。

また，不定胚の子葉が発達し"Green Spot"として認められるにいたったものをNAA無添加培地にプレーティングすることにより自立植物体を得ることができることを示し，"Green Spot"形成に関係する諸条件のうち，品種，NAA濃度，組織切片の令，細胞数，培養期間，継代培養回数，照明の有無，温度条件などと"Green Spot"形成との関係を調査し，さらにこの経路で得た自立植物体の遺伝変異を外部形態および染色体の面から調べ，継代培養により変異率が増す傾向を指摘している。これらの情報は不定胚を経由して植物を再生，増殖するに役立つものとして応用上からも評価できる。

以上の如く，本論文はカルスからの芽の分化に関し新知見を加えると共にその植物育種への応用の可能性を示したものであり，審査員一同は著者に農学博士の学位を授与してしかるべきものと認めた。